

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CONSERVACIÓN DE
LA MUESTRA Y LA ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE ANÁLISIS, PARA LA
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA HORMONA PARATIROIDEA
INTACTA EN SUERO, UTILIZANDO UNA METODOLOGÍA DE
ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE
RADIOINMUNOANÁLISIS DEL HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS

Trabajo final de investigación aplicada sometida a la consideración de la
Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades de Microbiología
para optar al grado y título de Especialidad en Química Clínica

ALEXA DANIELA MARÍN OBANDO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica
Diciembre, 2020

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. En primer lugar quiero agradecer al Dr. José Pablo Marín Gómez, Director del Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios, por su apoyo y por permitirme llevar a cabo las pruebas experimentales de este trabajo en el laboratorio. Luego, quiero agradecer a mi tutora la Dra. Pamela Loaiza Yee por su orientación y retroalimentación en el tema, durante el desarrollo del trabajo. Y por último, agradecer a todos mis compañeros que laboran en el Laboratorio de Radioinmunoanálisis del HSJD, los cuales me ayudaron al procesamiento de las muestras y a la obtención de los resultados que me permitieron concluir esta tesis.



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP
Ministerio de Educación
Superior

PPEMic
Programa de Posgrado en
Especialidades en Microbiología

**SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA**

ACTA-43-2020

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el martes 15 de diciembre de 2020 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **Alexa Daniela Marín Obando** carné # **B03677**, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de **Especialista en Química Clínica**. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Manuel Jiménez Díaz, PhD., quien preside, lector, Lorena Valverde Bolaños, Esp. y Melissa Carazo Gutiérrez, Esp., como lectoras y Pamela Loaiza Yee, Esp., tutora.

ARTICULO 1

Quien preside solicita a la postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: **"Estudio del efecto de la temperatura en la conservación de la muestra y el tiempo de análisis, para la determinación de la concentración de la Hormona Paratiroidea en suero, utilizando una metodología de electroquimioluminiscencia"**

ARTICULO 2



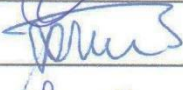


Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado ☒ Reprobado ☐

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y la Postulante, a las 17:00 horas.

Nombre	Firma	No. Cédula
Manuel Jiménez Díaz Quien preside		105840289
Pamela Loaiza Yee		303640095
Lorena Valverde Bolaños		109830355
Melissa Carazo Gutiérrez		1-10020353
Alexa Daniela Marín Obando Estudiante		3-0450-0699

Observaciones: _____

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita

Tabla de Contenido

Portada.....	i
Agradecimientos.....	ii
Hoja de aprobación.....	iii
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
Lista de tablas.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
Introducción.....	11
Hormona Paratiroidea.....	11
Biosíntesis de la PTH.....	11
Metabolismo periférico de la PTH.....	12
Acciones biológicas de la PTH.....	12
Patologías asociadas a una alteración de la PTH.....	13
Condiciones pre analíticas de la muestra para determinar la concentración de PTH.....	14
Metodologías para la determinación de PTH.....	14
Justificación.....	16
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	19
Metodología.....	20
Resultados.....	21
Discusión.....	31
Conclusiones.....	33
Referencias bibliográficas.....	34

Resumen

La hormona paratiroidea (PTH), es una hormona polipeptídica de 84 aminoácidos, que controla el nivel de calcio iónico en la sangre y líquido extracelular. En el tejido periférico es dividida en dos: en un extremo amino terminal, el cual tiene una vida media muy corta, además de ser el componente activo; y en un extremo carboxilo, que tiene una vida media más larga, pero no es activo. La secreción de PTH (1-84) intacta se metaboliza en gran medida en el hígado (70%) y en el riñón (20%), el fragmento carboxiloterminale es depurado por el riñón, mientras que el fragmento aminoterminale por el hígado y desaparece de la circulación con una vida media de 2 minutos. Para la determinación de la PTH, se deben tener en cuenta algunas variables preanalíticas: debe tomarse a las 10am, estar en ayunas y mantenerse en frío (4°C). Existen diferentes metodologías para su determinación, los más utilizados actualmente son los ensayos de segunda y tercera generación. El objetivo de este trabajo es analizar la variabilidad en los resultados de la determinación de la PTH intacta comparando diferentes variables pre analíticas para procesar la misma muestra de suero, con respecto a la temperatura y tiempo de análisis, para ello las muestras de sangre fueron extraídas aproximadamente a las 10am a 30 pacientes que se encontraban en ayunas. Se centrifugaron inmediatamente y se realizaron 6 alícuotas de suero para determinar la concentración de hormona paratiroidea en tres tiempos (basal, 2½ horas y 5½ horas) y de estas alícuotas, 3 se conservaron a temperatura ambiente y 3 a 4°C, cada determinación se realizó por duplicado, para un total de 12 determinaciones por muestra. El método utilizado para la determinación de PTH, fue un ensayo de tercera generación, Elecsys PTH, cobas®, que determina la PTH biointacta (1-84). Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando el software de R i386 3.6.1. Además se realizó el test de Shapiro-Wilk para evaluar normalidad, y el test de Levene para evaluar homocedasticidad, y finalmente se aplicó la prueba GLM Poisson para determinar diferencias significativas con un $p < 0,05$. Los resultados que se obtuvieron fueron valores de p en todos los grupos e interacciones mayores a 0,05, por lo que se llega a la conclusión de que no hay diferencias significativas en la concentración de PTH intacta analizada en diferentes condiciones pre analíticas, ni en las temperaturas (ambiente y frío), ni en los tiempos (basal, 2½ horas y 5½ horas) ni en sus interacciones. Es relevante tomar en cuenta la metodología utilizada, además del rol de trabajo de cada laboratorio al momento de definir las condiciones de procesamiento de este tipo de muestras, debido a que no existe un protocolo estandarizado para su determinación.

Abstract

Parathyroid hormone (PTH) is a polypeptide hormone of 84 amino acids, which controls the level of ionic calcium in the blood and extracellular fluid. In peripheral tissue it is divided into two: at an amino terminal end, which has a very short half-life, in addition to being the active component; and at a carboxyl end, which has a longer half-life, but is not active. Intact PTH (1-84) secretion is largely metabolized in the liver (70%) and kidney (20%), the carboxyl-terminal fragment is cleared by the kidney, while the amino-terminal fragment by the liver and disappears of circulation with a half-life of 2 minutes. For the determination of PTH, some preanalytical variables must be taken into account: the blood sample should be taken at 10am, fasting and kept at 4 ° C. There are different methodologies for its determination, the most used currently are second and third generation assays. The objective of this work is to analyze the variability in the results of the determination of intact PTH by comparing different pre-analytical variables to process the same serum sample, with respect to the temperature and analysis time, for which the blood samples were extracted at approximately 10am to 30 patients who were fasting. They were immediately centrifuged and 6 aliquots of serum were made to determine the concentration of parathyroid hormone in three times (basal, 2½ hours and 5½ hours) and of these aliquots, 3 were stored at room temperature and 3 at 4 ° C. Each determination was carried out in duplicate, for a total of 12 determinations per sample. The method used for the determination of PTH was a third generation assay, Elecsys PTH, cobas®, which determines biointact PTH (1-84). The data were statistically analyzed using R i386 3.6.1 software. In addition, the Shapiro-Wilk test was performed to assess normality, and the Levene test to assess homoscedasticity, and finally the GLM Poisson test was applied to determine significant differences with a $p < 0.05$. The results obtained were p values in all groups and interactions greater than 0.05, for which it is concluded that there are no significant differences in the concentration of intact PTH analyzed in different pre-analytical conditions, or in the temperatures (ambient and cold), neither in the times (basal, 2½ hours and 5½ hours) nor in their interactions. It is relevant to take into account the methodology used, in addition to the work flow of each laboratory when defining the processing conditions of this type of samples, since there is no standardized guidelines for their determination.

Lista de Tablas

Tabla 1. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a 4°C y analizadas inmediatamente después de extraída la muestra en el Laboratorio de Radioinmunoanálisis (RIA), Hospital San Juan de Dios (HSJD).....	21
Tabla 2. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a temperatura ambiente y analizadas inmediatamente después de extraída la muestra en el Laboratorio de RIA, HSJD.....	22
Tabla 3. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a 4°C y analizadas dos horas y media después de extraída la muestra, en el Laboratorio de RIA, HSJD.....	23
Tabla 4. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a temperatura ambiente y analizadas dos horas y media después de extraída la muestra, en el Laboratorio de RIA, HSJD.....	24
Tabla 5. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a 4°C y analizadas cinco horas y media después de extraída la muestra, en el Laboratorio de RIA, HSJD.....	25
Tabla 6. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a temperatura ambiente y analizadas cinco horas y media después de extraída la muestra, en el Laboratorio de RIA, HSJD.....	26
Tabla 7. Promedio de concentraciones de PTH obtenidas, a partir de muestras de suero conservadas a temperatura ambiente y 4°C analizadas en tres tiempos después de extraída la muestra (basal, dos horas y medias y cinco horas y media), en el Laboratorio de RIA, HSJD.....	27
Tabla 8. Resultados obtenidos al aplicar un estudio de estadística descriptiva en Excel de las concentraciones de PTH obtenidas en el Laboratorio de RIA del HSJD.....	29

Lista de Figuras

Gráfico 1. Efecto de la temperatura de conservación de la muestra de suero y tiempo de análisis, en la concentración obtenida de PTH, analizadas en el Laboratorio de RIA del HSJD, n=30.....	28
Figura 1. Resultados obtenidos al aplicar la prueba de Shapiro-Wilk en el software R para evaluar normalidad de los datos.....	28
Figura 2. Resultados obtenidos al aplicar la prueba Levene en el software R para evaluar homocedasticidad de los datos.....	29
Gráfico 2. Histograma obtenido para evaluar la normalidad de los datos del estudio del efecto de la temperatura de conservación de la muestra de suero y el tiempo de análisis, en la concentración obtenida de PTH.....	29
Figura 3. Resultados obtenidos al aplicar la prueba GLMPoisson en el software R, para evaluar diferencias significativas ($p<0,05$) en los diferentes tratamientos.....	30

Lista de Abreviaturas

PTH: Hormona paratiroidea

cTAL: asa gruesa descendente cortical de Henle

RIA: Laboratorio de Radioinmunoanálisis

HSJD: Hospital San Juan de Dios



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Alexa Daniela Marín Obando, con cédula de identidad 3-0450-0699, en mi condición de autor del TFG titulado Estudio del efecto de la temperatura en la reactivación de la muestra y la estabilidad en el tiempo de análisis, para la determinación de la concentración de la Hormona Paratiroidea intacta en suero, utilizando una metodología de electroquimioluminiscencia, realizado en el laboratorio de radioinmunoanálisis del HSSO

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO * ☐

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Alexa Daniela Marín Obando

Número de Carné: 303677 Número de cédula: 3-0450-0699

Correo Electrónico: ale_obal@hotmail.com

Fecha: 15/01/2021 Número de teléfono: 8659-7834

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Pamela Loaiza Yee

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Introducción

Hormona Paratiroidea

La hormona paratiroidea (PTH), es una hormona polipeptídica de 84 aminoácidos, que controla el nivel de calcio iónico en la sangre y líquido extracelular. Se une a los receptores de la superficie celular del hueso y el riñón, desencadenando respuestas que aumentan el calcio sanguíneo. La vitamina D activa actúa en el intestino para aumentar la absorción de calcio de la dieta, además de promover el flujo de calcio a la sangre desde el hueso y el riñón; este aumento de calcio plasmático y de la vitamina D activa retroalimenta la glándula paratiroides para disminuir la secreción de la PTH. Las glándulas paratiroides, el hueso, el riñón y el intestino son los órganos principales en la participación de la homeostasis del calcio dependiente de la PTH (Vela et al, 2013).

Biosíntesis de la PTH

La PTH, pertenece al grupo de las hormonas peptídicas, estas hormonas se secretan en forma de vesículas rodeadas de membranas. El péptido inicial que sale del ribosoma, se denomina preprohormona, ésta contiene una o más copias de la hormona peptídica, y es dirigida hacia el lumen del retículo endoplasmático por medio de secuencias señales, las cuales se van perdiendo conforme se van moviendo por el retículo endoplasmático y complejo de Golgi, hasta formar la prohormona, igualmente inactiva. Cuando la prohormona llega al aparato de Golgi, es empaquetada en vesículas secretoras junto con enzimas proteolíticas, que cortan a la prohormona y generan las hormonas activas. Las vesículas secretoras se mantienen en la glándula endocrina, hasta que reciban las señales para su secreción (Silverthorn et al, 2009). En respuesta a una disminución en la concentración de calcio sérico, la PTH es sintetizada en el retículo endoplásmico de las células paratiroides, los receptores de calcio de las células paratiroides están asociados a una proteína G que estimula una fosfolipasa C β , la cual produce IP₃, que genera un aumento de calcio intracelular y de AMPc y a su vez la secreción de PTH (Quesada, A, 2015). Son muy solubles en agua y esto les facilita su transporte en el organismo a través del líquido extracelular. El mecanismo de acción de estas hormonas en las células diana es por medio de su unión a receptores de membrana que se encuentran en la superficie de la célula, y esa interacción genera una transducción de señales, la respuesta de la célula a estas

hormonas por lo general es una respuesta rápida debido a los segundos mensajeros (Silverthorn et al, 2009). Los órganos diana de esta hormona son: hueso, riñón e intestino (Díaz et al, 1997).

Metabolismo periférico de la PTH

En el tejido periférico la PTH es dividida en dos: en un extremo amino terminal, el cual tiene una vida media muy corta y es el componente activo; y en un extremo carboxilo, el cual tiene una vida media más larga, pero no es activo (Quesada, A, 2015). La relación de la PTH activa e inactiva disminuye con el aumento del calcio plasmático, en situaciones de hipocalcemia la proporción de PTH intacta secretada es mayor (De la Piedra et al, 2008). La secreción de PTH (1-84) intacta se metaboliza en gran medida en el hígado (70%) y en el riñón (20%), el fragmento carboxilotermino es depurado por el riñón, mientras que el fragmento aminotermino por el hígado y desaparece de la circulación con una vida media de 2 minutos. La concentración de fragmentos carboxi-terminales son mayores (80%) que los niveles de PTH intacta (20%) (De la Piedra et al, 2008) y aunque se desconoce su función, estudios experimentales con PTH (7-84) sugieren que estos fragmentos carboxilo extendidos ejercen efectos antagonistas de los de la PTH intacta (Vela et al, 2013). La eliminación de los fragmentos C-terminal es más lenta que la de la hormona intacta y dependiente de la función renal, lo que lleva a su acumulación y a concentraciones muy elevadas en los pacientes con falla renal grave o terminal (SCPC, 2017), en estos pacientes se encuentran en una proporción de 95% (De la Piedra et al, 2008).

Acciones biológicas de la PTH

A nivel renal:

- Reabsorción de calcio por los túbulos renales: el 65% se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal y el túbulo delgado a través de un transporte pasivo paracelular; la PTH afecta poco al flujo de calcio en esta región. El resto se reabsorbe más distalmente, menos del 20% del filtrado en el asa gruesa descendente cortical de Henle (cTAL) y el 10% en el túbulo contorneado y en los túbulos colectores. El receptor sensible al calcio se expresa en la cTAL (Vela et al, 2013).
- Inhibición del transporte de fosfato (reduce la reabsorción de fosfato): la reabsorción de fosfato en los túbulos proximal y distal inhibe la PTH aunque el efecto proximal es cuantitativamente más importante (Vela et al, 2013).

- Estimulación de la α -1-hidroxilasa, que transforma la 25-(OH)-D3, en 1,25-(OH) 2D3, la cual se encarga de controlar la absorción intestinal de calcio (Díaz et al, 1997).

A nivel óseo:

- Actúa sobre diferentes tipos celulares y aumenta tanto la formación como la resorción ósea. Respecto a la homeostasis del calcio predomina la resorción ósea (Vela et al, 2013). Estimula la resorción ósea por medio de los osteocitos inicialmente, si se necesita un estímulo mayor, lo hace por medio de los osteoclastos, los cuales no tienen receptores para PTH, pero embargo los osteoblastos y pre osteoblastos señalizan a los precursores de los osteoclastos para que se unan y formen osteoclastos maduros, los osteoclastos disuelven la matriz orgánica y libera hidroxiprolina a suero y orina (Díaz et al, 1997).

A nivel intestinal: como se explicó anteriormente, lo hace por medio de la activación de la vitamina D (Díaz et al, 1997).

Patologías asociadas a una alteración de la PTH

Las principales patologías asociadas a un aumento de PTH son (Quesada, A, 2015):

- Hiperparatiroidismo primario: PTH, Calcio y Vitamina D aumentadas
- Hiperparatiroidismo secundario: PTH, Calcio aumentados y Vitamina D disminuida.
- Pseudohiperparatiroidismo (resistencia del órgano final a PTH): PTH aumentada, Calcio y Vitamina D disminuidas.
 - Síndrome de Zollinger-Ellison
 - Dependencia de vitamina D
 - Carcinoma medular de tiroides
 - Acromegalia

Las principales patologías asociadas a una disminución de PTH son (Quesada, A, 2015):

- Hipoparatiroidismo: PTH, Calcio y Vitamina D disminuidos
- Posttiroidectomía
- Sarcoidosis
- Hipomagnesemia

- Horas matutinas
- Hipercalcemia por malignidad: Calcio aumentado y PTH y Vitamina D disminuidas.

Condiciones pre analíticas de la muestra para determinar la concentración sérica de PTH

Para la determinación de la PTH, se deben tener en cuenta algunas variables preanalíticas, que sugiere la literatura para su correcta interpretación, dentro de estas se encuentran:

- La muestra debe tomarse a las 10am, ya que esta hormona tiene un ritmo bimodal, durante la noche presenta una acrofase, y a media mañana una fase nadir (de 10am a 4pm), en esta fase es donde se recomienda tomar la muestra (Cavalier et al, 2015).
- El paciente debe estar en ayunas, para evitar interferencia por el calcio de la dieta (Díaz et al, 1997).
- La muestra se debe conservar en frío (4°C) para una mayor estabilidad, por su corta vida media (Hanon et al, 2013).

Metodologías para la determinación de PTH

Existen métodos inmunológicos para la determinación de la PTH intacta y sus segmentos N-terminal y C-terminal, la determinación de la PTH intacta es más exacta para comprobar la funcionalidad de la glándula paratiroides y para diferenciar entre una hipercalcemia por hiperparatiroidismo o por condiciones extraparatiroides (Díaz et al, 1997).

En un inicio, la primera metodología utilizada, fue un radioinmunoensayo (ensayo de primera generación), este utilizaba anticuerpos policlonales contra los residuos carboxilo terminal, la principal limitante, fue la interferencia de estos residuos en pacientes con insuficiencia renal (Hanon et al, 2015), además de su inespecificidad por el uso de un solo anticuerpo (Fradinger, 2015).

Luego de esto, en el año 1980, se introdujeron los ensayos de segunda generación (ensayos radioinmunométricos, IRMA), estos utilizaban dos anticuerpos monoclonales contra los fragmentos C y N-terminal que podrían sobreestimar los valores de PTH intacta (Hanon et al, 2015). El primer anticuerpo (de captura) fue dirigido contra la región C-terminal (aminoácidos 34-84) y el segundo anticuerpo (de detección) dirigido contra la región N-terminal (aminoácidos 15-32), se desarrollaron

primero plataformas de quimioluminiscencia y luego electroquimioluminiscencia. Estos ensayos se siguen utilizando y su principal inconveniente, es que en pacientes con enfermedad renal crónica, se sobreestima la concentración de PTH como se dijo anteriormente, debido a que estos ensayos además de determinar la PTH intacta, determinan fragmentos inactivos (aminoácidos 7-84) (Fradinger, 2015).

Los ensayos de tercera generación surgieron en respuesta a la limitante de los ensayos de segunda generación con respecto a los fragmentos 7-84, y para esto utilizan anticuerpos monoclonales contra los primeros 4 residuos del fragmento N-terminal y contra el fragmento C-terminal (Hanon et al, 2015). El fragmento N-terminal no tiene tanto interés clínico porque tiene una vida media corta y sólo permite ver las fluctuaciones de la secreción hormonal en cada momento, mientras que el C-terminal tiene un recambio plasmático más prolongado, por lo tanto de ser posible se prefiere la determinación de la PTH intacta y sino del fragmento C-terminal, solamente en los cuadros de insuficiencia renal, que es preferible la determinación del fragmento N-terminal, debido a que los fragmentos C-terminal son metabolizados en el riñón y en estos pacientes estos fragmentos se acumulan y disminuyen la exactitud de la determinación (Díaz et al, 1997).

Justificación

La determinación de la concentración de PTH, es una prueba de rutina en el Laboratorio de Radioinmunoanálisis del HSJD, en este laboratorio se realizan aproximadamente 430 determinaciones por mes, principalmente en pacientes para el diagnóstico diferencial de hiperparatiroidismo primario, trastornos en el metabolismo óseo y para el seguimiento de pacientes en hemodiálisis.

La determinación de la concentración de PTH es utilizada principalmente para diferenciar entre un hiperparatiroidismo primario o secundario; dependiendo de la concentración de calcio, hipercalcemia o hipocalcemia respectivamente. El hiperparatiroidismo primario es el tercer trastorno endocrino más común, con una presentación asintomática en la mayoría de los casos, y por ello la medición de los niveles de PTH es de suma importancia para su diagnóstico (Cavalier et al, 2015). En la rutina diaria, la concentración de PTH es muy utilizada en el control de pacientes hemodializados, ya que en estos pacientes, los fragmentos C terminales de la PTH se acumulan debido a que es en el riñón donde son metabolizados (Díaz, et al, 1997), es por esto que en pacientes hemodializados, las pautas de KDIGO recomiendan mantener los niveles séricos de PTH entre dos y nueve veces el límite superior normal del rango de referencia (Cavalier et al, 2015). En los pacientes con hemodiálisis, se utiliza para el manejo clínico de la enfermedad, de este modo, si los valores de PTH superan el límite definido para este tipo de pacientes, se suministran fármacos, como componentes activos de vitamina D, por el contrario, si los valores son inferiores, se debe interrumpir el tratamiento para impedir una osteopatía adinámica con calcificación extraesquelética asociada (Souberbielle et al, 2010), además de que las concentraciones bajas de PTH debidas a concentraciones altas de calcio dializado están asociadas con un riesgo elevado de muerte cardiovascular (Merle et al, 2016). También, la determinación de la concentración de PTH se realiza principalmente a pacientes con insuficiencia renal crónica, así como en pacientes sin enfermedad renal para identificar los subtipos de osteodistrofia renal y para detectar trastornos del metabolismo del calcio y del fosfato (Souberbielle et al, 2006). Diferentes estudios realizados han llegado a la conclusión de que un mayor nivel de paratohormona se asocian a hiperfosfatemia, y que un nivel mayor de fosfatos se asocia por ende a mayor morbilidad cardiovascular y mortalidad (Butrón, 2017). En el 2018, en Costa Rica, el número de pacientes diagnosticados con insuficiencia renal crónica y en tratamiento de hemodiálisis aumentó en los últimos seis años un 317%; de 269 casos en el 2011, pasó a 855 casos y de estos pacientes, 208 reciben tratamiento de hemodiálisis (Bustamante, 2018).

La evaluación de algunas variables pre analíticas que conlleva la determinación de la concentración de PTH valoradas en este trabajo, podría ser de utilidad para agilizar todo el procesamiento de este tipo de muestras y con esto asegurar a los pacientes con las condiciones patológicas mencionadas anteriormente un resultado rápido, confiable y fidedigno.

Hipótesis

No existen diferencias significativas en la concentración de PTH, al determinar las muestras en frío y a temperatura ambiente, ni diferencias a lo largo del tiempo de análisis.

Objetivos

General

Analizar la variabilidad en los resultados de la determinación de la PTH intacta comparando diferentes variables preanalíticas como lo son la temperatura y tiempo de análisis.

Específicos

- Evaluar si hay diferencias significativas en la concentración de PTH intacta en muestras de suero conservadas a temperatura ambiente y frío, con el fin de valorar la necesidad de la conservación de la muestra en frío, luego de su separación.
- Evaluar la estabilidad de la muestra de suero, determinando la concentración de la PTH en diferentes tiempos, tanto de muestras de suero conservadas a temperatura ambiente como en frío.

Metodología

Sujetos

Las muestras de sangre fueron extraídas aproximadamente a las 10am a 30 pacientes que se encontraban en ayunas. Se trabajaron con los residuos de suero de las muestras de los pacientes y fueron elegidos de forma aleatoria sin trazabilidad de datos, por lo que no se les solicitó consentimiento informado.

Protocolo de trabajo

Las muestras se centrifugaron inmediatamente y se realizaron 6 alícuotas de suero para determinar la concentración de hormona paratiroidea en tres tiempos (basal, 2½ horas y 5½ horas) y de estas alícuotas, 3 se conservaron a temperatura ambiente y 3 en frío (aproximadamente 4°C), cada determinación se realizó por duplicado, para un total de 12 determinaciones por muestra.

Método

El método utilizado para la determinación de PTH, fue un ensayo de tercera generación, Elecsys PTH, cobas®, este método de electroquimioluminiscencia, se basa en un ensayo tipo sándwich, en el que un anticuerpo monoclonal biotinilado reacciona con el fragmento N-terminal de la PTH mientras que un anticuerpo monoclonal marcado con quelato de rutenio reacciona con el fragmento C-terminal de la PTH, lo que se determina es la PTH biointacta (1-84).

Análisis de resultados

Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando el software de R i386 3.6.1. Se realizó el test de Shapiro-Wilk para evaluar normalidad, y el test de Levene para evaluar homocedasticidad, y finalmente se aplicó la prueba GLM Poisson para determinar diferencias significativas con un $p < 0,05$.

Resultados

Tabla 1. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a 4°C y analizadas inmediatamente después de extraída la muestra en el Laboratorio de Radioinmunoanálisis (RIA), Hospital San Juan de Dios (HSJD)

Muestra	Concentración (pg/mL) Réplica 1	Concentración (pg/mL) Réplica 2	Promedio (pg/mL)	DE (pg/mL)	%CV
1	45,00	47,00	46,00	1,41	3,07
2	109,00	108,00	108,50	0,71	0,65
3	39,70	42,90	41,30	2,26	5,48
4	30,40	31,50	30,95	0,78	2,51
5	72,90	74,60	73,75	1,20	1,63
6	38,90	40,40	39,65	1,06	2,68
7	18,20	19,00	18,60	0,57	3,04
8	37,90	37,90	37,90	0,00	0,00
9	106,00	102,00	104,00	2,83	2,72
10	59,30	56,90	58,10	1,70	2,92
11	72,20	73,70	72,95	1,06	1,45
12	68,30	66,50	67,40	1,27	1,89
13	123,00	124,00	123,50	0,71	0,57
14	20,60	21,60	21,10	0,71	3,35
15	67,90	71,90	69,90	2,83	4,05
16	213,00	220,00	216,50	4,95	2,29
17	39,40	36,70	38,05	1,91	5,02
18	63,20	61,50	62,35	1,20	1,93
19	32,50	32,20	32,35	0,21	0,66
20	118,00	111,00	114,50	4,95	4,32
21	126,00	133,00	129,50	4,95	3,82
22	20,40	20,10	20,25	0,21	1,05
23	28,20	27,30	27,75	0,64	2,31
24	29,50	30,00	29,75	0,35	1,19
25	131,00	135,00	133,00	2,83	2,13
26	89,30	87,70	88,50	1,13	1,28
27	105,00	98,10	101,55	4,88	4,80
28	28,80	27,90	28,35	0,64	2,24
29	178,00	191,00	184,50	9,19	4,98
30	52,80	52,50	52,65	0,21	0,40

Tabla 2. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a temperatura ambiente y analizadas inmediatamente después de extraída la muestra en el Laboratorio de RIA, HSJD

Muestra	Concentración (pg/mL) Réplica 1	Concentración (pg/mL) Réplica 2	Promedio (pg/mL)	DE (pg/mL)	%CV
1	42,50	45,30	43,90	1,98	4,51
2	117,01	118,00	117,51	0,70	0,60
3	41,60	42,40	42,00	0,57	1,35
4	30,90	30,20	30,55	0,49	1,62
5	80,00	82,00	81,00	1,41	1,75
6	42,10	42,60	42,35	0,35	0,83
7	19,60	19,50	19,55	0,07	0,36
8	37,80	38,00	37,90	0,14	0,37
9	113,00	115,00	114,00	1,41	1,24
10	62,20	61,80	62,00	0,28	0,46
11	74,50	73,20	73,85	0,92	1,24
12	69,40	69,80	69,60	0,28	0,41
13	118,00	117,00	117,50	0,71	0,60
14	21,90	21,70	21,80	0,14	0,65
15	67,40	71,50	69,45	2,90	4,17
16	221,00	222,00	221,50	0,71	0,32
17	38,90	40,30	39,60	0,99	2,50
18	65,70	66,30	66,00	0,42	0,64
19	34,10	34,50	34,30	0,28	0,82
20	125,00	125,00	125,00	0,00	0,00
21	132,00	131,00	131,50	0,71	0,54
22	20,80	21,30	21,05	0,35	1,68
23	27,30	27,30	27,30	0,00	0,00
24	29,50	29,40	29,45	0,07	0,24
25	136,00	137,00	136,50	0,71	0,52
26	97,00	94,10	95,55	2,05	2,15
27	103,00	101,00	102,00	1,41	1,39
28	30,40	29,60	30,00	0,57	1,89
29	162,00	170,00	166,00	5,66	3,41
30	49,70	50,10	49,90	0,28	0,57

Tabla 3. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a 4°C y analizadas dos horas y media después de extraída la muestra, en el Laboratorio de RIA, HSJD

Muestra	Concentración (pg/mL) Réplica 1	Concentración (pg/mL) Réplica 2	Promedio (pg/mL)	DE (pg/mL)	%CV
1	46,60	45,90	46,25	0,49	1,07
2	110,00	110,00	110,00	0,00	0,00
3	43,10	43,50	43,30	0,28	0,65
4	32,50	32,60	32,55	0,07	0,22
5	73,80	72,60	73,20	0,85	1,16
6	41,60	40,80	41,20	0,57	1,37
7	19,70	19,40	19,55	0,21	1,09
8	37,30	37,10	37,20	0,14	0,38
9	105,00	107,00	106,00	1,41	1,33
10	59,40	60,50	59,95	0,78	1,30
11	75,30	74,50	74,90	0,57	0,76
12	67,20	69,10	68,15	1,34	1,97
13	119,00	119,00	119,00	0,00	0,00
14	22,10	21,90	22,00	0,14	0,64
15	67,30	70,20	68,75	2,05	2,98
16	222,00	220,00	221,00	1,41	0,64
17	37,90	38,10	38,00	0,14	0,37
18	60,50	60,50	60,50	0,00	0,00
19	32,80	33,10	32,95	0,21	0,64
20	122,00	121,00	121,50	0,71	0,58
21	127,00	125,00	126,00	1,41	1,12
22	20,80	20,10	20,45	0,49	2,42
23	26,60	27,60	27,10	0,71	2,61
24	29,20	29,90	29,55	0,49	1,68
25	132,00	136,00	134,00	2,83	2,11
26	93,10	91,80	92,45	0,92	0,99
27	95,40	99,40	97,40	2,83	2,90
28	27,60	27,40	27,50	0,14	0,51
29	178,00	177,00	177,50	0,71	0,40
30	54,50	53,50	54,00	0,71	1,31

Tabla 4. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a temperatura ambiente y analizadas dos horas y media después de extraída la muestra, en el Laboratorio de RIA, HSJD

Muestra	Concentración (pg/mL) Réplica 1	Concentración (pg/mL) Réplica 2	Promedio (pg/mL)	DE (pg/mL)	%CV
1	44,10	43,00	43,55	0,78	1,79
2	113,00	113,00	113,00	0,00	0,00
3	41,90	42,10	42,00	0,14	0,34
4	30,80	31,60	31,20	0,57	1,81
5	78,20	78,00	78,10	0,14	0,18
6	42,10	41,40	41,75	0,49	1,19
7	19,30	19,60	19,45	0,21	1,09
8	36,40	37,00	36,70	0,42	1,16
9	106,00	106,00	106,00	0,00	0,00
10	60,90	61,40	61,15	0,35	0,58
11	71,80	73,50	72,65	1,20	1,65
12	66,20	66,30	66,25	0,07	0,11
13	115,00	115,00	115,00	0,00	0,00
14	21,30	21,80	21,55	0,35	1,64
15	66,90	68,10	67,50	0,85	1,26
16	212,00	215,00	213,50	2,12	0,99
17	39,50	39,00	39,25	0,35	0,90
18	65,00	64,60	64,80	0,28	0,44
19	33,60	34,00	33,80	0,28	0,84
20	119,00	119,00	119,00	0,00	0,00
21	127,00	126,00	126,50	0,71	0,56
22	20,70	21,10	20,90	0,28	1,35
23	26,40	27,40	26,90	0,71	2,63
24	28,00	28,80	28,40	0,57	1,99
25	130,00	131,00	130,50	0,71	0,54
26	91,70	93,10	92,40	0,99	1,07
27	94,50	94,30	94,40	0,14	0,15
28	29,10	29,40	29,25	0,21	0,73
29	162,00	161,00	161,50	0,71	0,44
30	51,20	50,60	50,90	0,42	0,83

Tabla 5. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a 4°C y analizadas cinco horas y media después de extraída la muestra, en el Laboratorio de RIA, HSJD

Muestra	Concentración (pg/mL) Réplica 1	Concentración (pg/mL) Réplica 2	Promedio (pg/mL)	DE (pg/mL)	%CV
1	45,70	44,80	45,25	0,64	1,41
2	113,00	110,00	111,50	2,12	1,90
3	42,70	43,70	43,20	0,71	1,64
4	32,10	31,00	31,55	0,78	2,47
5	73,70	72,60	73,15	0,78	1,06
6	40,50	40,20	40,35	0,21	0,53
7	19,50	19,00	19,25	0,35	1,84
8	38,60	38,00	38,30	0,42	1,11
9	108,00	104,00	106,00	2,83	2,67
10	60,20	59,40	59,80	0,57	0,95
11	74,20	73,00	73,60	0,85	1,15
12	69,20	67,10	68,15	1,48	2,18
13	120,00	121,00	120,50	0,71	0,59
14	20,30	20,70	20,50	0,28	1,38
15	68,40	69,00	68,70	0,42	0,62
16	205,00	217,00	211,00	8,49	4,02
17	38,50	38,30	38,40	0,14	0,37
18	60,90	60,50	60,70	0,28	0,47
19	32,20	32,70	32,45	0,35	1,09
20	120,00	120,00	120,00	0,00	0,00
21	125,00	123,00	124,00	1,41	1,14
22	20,70	20,20	20,45	0,35	1,73
23	27,10	26,80	26,95	0,21	0,79
24	29,40	28,70	29,05	0,49	1,70
25	132,00	132,00	132,00	0,00	0,00
26	93,20	93,20	93,20	0,00	0,00
27	95,60	94,90	95,25	0,49	0,52
28	27,80	27,60	27,70	0,14	0,51
29	171,00	179,00	175,00	5,66	3,23
30	55,40	53,40	54,40	1,41	2,60

Tabla 6. Concentraciones de PTH obtenidas por duplicado, a partir de una muestra de suero conservada a temperatura ambiente y analizadas cinco horas y media después de extraída la muestra, en el Laboratorio de RIA, HSJD

Muestra	Concentración (pg/mL) Réplica 1	Concentración (pg/mL) Réplica 2	Promedio (pg/mL)	DE (pg/mL)	%CV
1	42,70	43,00	42,85	0,21	0,50
2	112,00	111,00	111,50	0,71	0,63
3	42,20	41,80	42,00	0,28	0,67
4	31,30	31,10	31,20	0,14	0,45
5	78,60	78,00	78,30	0,42	0,54
6	40,20	41,60	40,90	0,99	2,42
7	19,30	19,80	19,55	0,35	1,81
8	36,70	37,00	36,85	0,21	0,58
9	106,00	105,00	105,50	0,71	0,67
10	60,50	60,70	60,60	0,14	0,23
11	71,00	72,00	71,50	0,71	0,99
12	64,90	64,30	64,60	0,42	0,66
13	115,00	115,00	115,00	0,00	0,00
14	20,80	20,90	20,85	0,07	0,34
15	66,30	65,50	65,90	0,57	0,86
16	205,00	207,00	206,00	1,41	0,69
17	38,60	38,80	38,70	0,14	0,37
18	64,10	62,00	63,05	1,48	2,36
19	33,30	33,30	33,30	0,00	0,00
20	118,00	116,00	117,00	1,41	1,21
21	125,00	123,00	124,00	1,41	1,14
22	21,10	20,90	21,00	0,14	0,67
23	26,70	27,20	26,95	0,35	1,31
24	27,10	27,20	27,15	0,07	0,26
25	123,00	122,00	122,50	0,71	0,58
26	89,90	90,50	90,20	0,42	0,47
27	96,50	92,50	94,50	2,83	2,99
28	28,00	28,70	28,35	0,49	1,75
29	158,00	161,00	159,50	2,12	1,33
30	49,20	48,90	49,05	0,21	0,43

Tabla 7. Promedio de concentraciones de PTH obtenidas, a partir de muestras de suero conservadas a temperatura ambiente y 4°C analizadas en tres tiempos después de extraída la muestra (basal, dos horas y medias y cinco horas y media), en el Laboratorio de RIA, HSJD

Muestra	4°C Basal (pg/mL)	Temperatura ambiente Basal (pg/mL)	4°C 2½ horas (pg/mL)	Temperatura ambiente 2½ horas (pg/mL)	4°C 5½ horas (pg/mL)	Temperatura ambiente 5½ horas (pg/mL)
1	46,00	43,90	46,25	43,55	45,25	42,85
2	108,50	117,51	110,00	113,00	111,50	111,50
3	41,30	42,00	43,30	42,00	43,20	42,00
4	30,95	30,55	32,55	31,20	31,55	31,20
5	73,75	81,00	73,20	78,10	73,15	78,30
6	39,65	42,35	41,20	41,75	40,35	40,90
7	18,60	19,55	19,55	19,45	19,25	19,55
8	37,90	37,90	37,20	36,70	38,30	36,85
9	104,00	114,00	106,00	106,00	106,00	105,50
10	58,10	62,00	59,95	61,15	59,80	60,60
11	72,95	73,85	74,90	72,65	73,60	71,50
12	67,40	69,60	68,15	66,25	68,15	64,60
13	123,50	117,50	119,00	115,00	120,50	115,00
14	21,10	21,80	22,00	21,55	20,50	20,85
15	69,90	69,45	68,75	67,50	68,70	65,90
16	216,50	221,50	221,00	213,50	211,00	206,00
17	38,05	39,60	38,00	39,25	38,40	38,70
18	62,35	66,00	60,50	64,80	60,70	63,05
19	32,35	34,30	32,95	33,80	32,45	33,30
20	114,50	125,00	121,50	119,00	120,00	117,00
21	129,50	131,50	126,00	126,50	124,00	124,00
22	20,25	21,05	20,45	20,90	20,45	21,00
23	27,75	27,30	27,10	26,90	26,95	26,95
24	29,75	29,45	29,55	28,40	29,05	27,15
25	133,00	136,50	134,00	130,50	132,00	122,50
26	88,50	95,55	92,45	92,40	93,20	90,20
27	101,55	102,00	97,40	94,40	95,25	94,50
28	28,35	30,00	27,50	29,25	27,70	28,35
29	184,50	166,00	177,50	161,50	175,00	159,50
30	52,65	49,90	54,00	50,90	54,40	49,05

Para la visualización de los datos, se agruparon por temperaturas y tiempos de análisis y se realizó un gráfico de cajas en el software R.

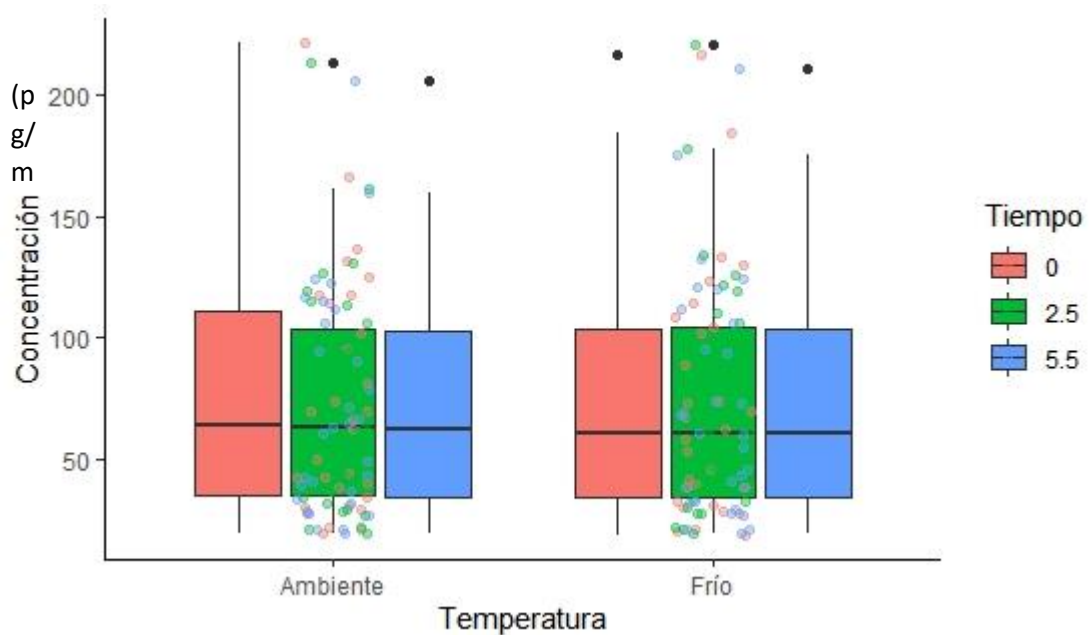


Gráfico 1. Efecto de la temperatura de conservación de la muestra de suero y tiempo de análisis, en la concentración obtenida de PTH, analizadas en el Laboratorio de RIA del HSJD, n=30.

Se evaluó la homocedasticidad de los datos con la prueba Levene y la normalidad con la prueba de Shapiro y se obtuvieron los siguientes resultados:

Prueba de Shapiro-Wilk código utilizado: shapiro.test
(Trabajo_PTH_R\$Concentración):

shapiro-wilk normality test

data: Trabajo_PTH_R\$Concentración
W = 0.88117, p-value = 9.416e-11

Figura 1. Resultados obtenidos al aplicar la prueba de Shapiro-Wilk en el software R para evaluar normalidad de los datos.

Prueba Levene, código utilizado: leveneTest
(Trabajo_PTH_R\$Concentración~Trabajo_PTH_R\$Temperatura*Trabajo_PTH_R\$Tiempo):

```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group  5  0.0279 0.9996
      174

```

Figura 2. Resultados obtenidos al aplicar la prueba Levene en el software R para evaluar homocedasticidad de los datos.

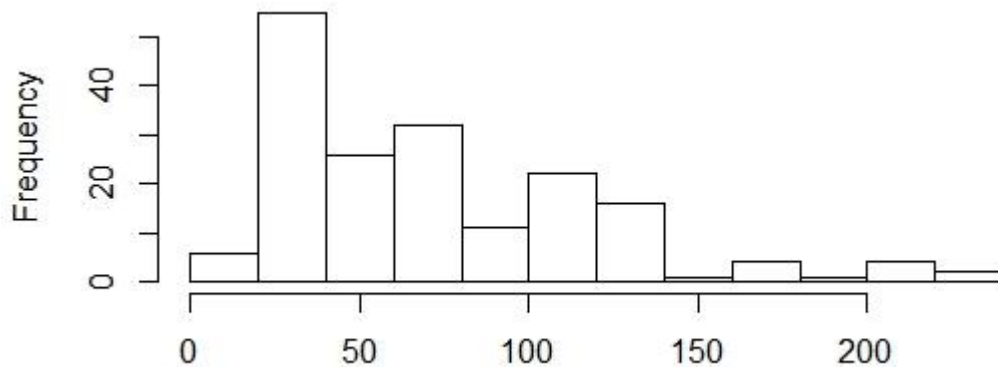


Gráfico 2. Histograma obtenido para evaluar la normalidad de los datos del estudio del efecto de la temperatura de conservación de la muestra de suero y el tiempo de análisis, en la concentración obtenida de PTH

Concentración	
Media	72,16780556
Error típico	3,550228686
Mediana	60,925
Moda	42
Desviación estándar	47,63131607
Varianza de la muestra	2268,742271
Curtosis	0,971930802
Coeficiente de asimetría	1,145196917
Rango	202,9
Mínimo	18,6
Máximo	221,5
Suma	12990,205
Cuenta	180
Nivel de confianza (95,0%)	7,005685558

Tabla 8. Resultados obtenidos al aplicar un estudio de estadística descriptiva en Excel de las concentraciones de PTH obtenidas en el Laboratorio de RIA del HSJD

Según estos resultados, no hay una distribución normal, los datos se encuentran sesgados a la derecha, por lo que se procede a aplicar una prueba no paramétrica, GLM Poisson, con la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

```
> modelo2<-glm(Concentración~Temperatura*Tiempo,data=Trabajo_PTH_R,family=quasi
poisson)
> summary(modelo2)
```

Call:
glm(formula = Concentración ~ Temperatura * Tiempo, family = quasipoisson,
data = Trabajo_PTH_R)

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-7.556	-5.176	-1.318	3.753	13.954

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	4.30344	0.12067	35.663	<2e-16 ***
TemperaturaFrío	-0.02070	0.17154	-0.121	0.904
Tiempo2.5	-0.03241	0.17205	-0.188	0.851
Tiempo5.5	-0.05097	0.17287	-0.295	0.768
TiempoBasal	0.032411	0.172051	0.188	0.851
TemperaturaFrío:Tiempo2.5	0.03643	0.24346	0.150	0.881
TemperaturaFrío:Tiempo5.5	0.04507	0.24434	0.184	0.854
TemperaturaFrío:TiempoBasal	-0.036430	0.243461	-0.150	0.881
TemperaturaAmbiente	-0.015729	0.172762	-0.091	0.928
TemperaturaAmbiente:Tiempo5.5	-0.008636	0.245199	-0.035	0.972
TemperaturaAmbiente:TiempoBasal	0.036430	0.243461	0.150	0.881
TemperaturaAmbiente:Tiempo2.5	-0.036430	0.243461	-0.150	0.881

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for quasipoisson family taken to be 32.30506)

Null deviance: 5164.4 on 179 degrees of freedom
Residual deviance: 5161.2 on 174 degrees of freedom
AIC: NA

Figura 3. Resultados obtenidos al aplicar la prueba GLMPoisson en el software R, para evaluar diferencias significativas ($p<0,05$) en los diferentes tratamientos.

Discusión

La estabilidad de un analito bioquímico se puede definir como el período en que la concentración de ese analito se mantiene dentro de los límites establecidos, conservando la muestra en la que se realiza la medición en condiciones específicas. Esta estabilidad está influida por variables preanalíticas y analíticas. Las variables preanalíticas son un componente importante de la calidad en los laboratorios, ya que las muestras por lo general no se procesan inmediatamente después de su extracción y las variaciones en su conservación pueden alterar sus componentes e influir en los resultados obtenidos (Morales et al, 2008), es por ello que en este trabajo se evaluaron algunas variables preanalíticas en la determinación de PTH y así aplicar los protocolos que mejor se ajusten a nuestras condiciones de trabajo.

Al observar los datos de las Tablas 1 a la 6, se puede ver que en general los coeficientes de variación entre las réplicas son bajos, la mayoría menores al 3%, y que en promedio los coeficientes de variación en cada tratamiento se mantienen entre 1 y 3%, con lo cual se puede concluir que el método tiene una buena precisión y esto concuerda con los datos del inserto, en el cual la repetibilidad de los controles está en el nivel 1: 2,4% y nivel 2: 1,7% y precisión intermedia 4,2% y 3,8%, respectivamente. También concuerda con los datos del laboratorio, en los cuales la repetibilidad está en 1,3% para el nivel 1 y 1,6% para el nivel 2, y la precisión intermedia está en 1,4% y 1,6% respectivamente.

Luego, en la Tabla 7, se encuentran los datos de los promedios de las concentraciones obtenidas en los diferentes tiempos y temperaturas, y con estos se creó un gráfico de cajas (ver Gráfico 1), en el cual visualmente se puede concluir que no hay diferencias entre ambas temperaturas ni en los diferentes tiempos.

El análisis estadístico de los datos se inició con las pruebas de normalidad y homocedasticidad. Con la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, se obtuvo un valor de $p < 0,05$ (ver Figura 1), esto nos indica que los datos no presentan una distribución normal. Luego, con la prueba de Levene, se evaluó la homocedasticidad, obteniéndose un valor de $p > 0,05$, lo cual indica que los datos no presentan diferencias en sus varianzas, es decir, si presentan homocedasticidad. Estos resultados se complementaron con un histograma (ver Gráfico 2), en el cual se puede observar que los datos se encuentran sesgados a la derecha, y además con la estadística descriptiva aplicada (ver Tabla 8) en la cual por medio del índice de asimetría también se puede verificar que los datos no presentan normalidad y que tienen una asimetría positiva. Debido a estos resultados, se decidió aplicar una prueba de GLM Poisson, para determinar si existen diferencias significativas en las concentraciones de PTH de

muestras de suero conservadas a temperatura ambiente y 4°C, y además analizadas en un lapso de tiempo (hasta aproximadamente 5½ horas después de extraída y separada la muestra de suero), con los resultados obtenidos en esta prueba se puede concluir que no hay diferencias significativas ni en las temperaturas (ambiente y 4°C), ni en los tiempos (basal, 2½ horas y 5½ horas) ni en sus interacciones (ver Figura 3), estos resultados no concuerdan completamente con otros estudios realizados. En un estudio realizado por Levin et al, observaron una disminución progresiva de la PTH intacta sérica conservada a temperatura ambiente en un periodo de 72 horas, mientras que las muestras extraídas en tubos de EDTA, heparina o inhibidores de proteasas, se mantuvieron estables durante este período (Levin et al, 1994), por otro lado, según Newman et al, la PTH intacta permanece estable en sangre total y suero hasta por 6 horas a temperatura ambiente y tiene una disminución significativa después de las 18 horas (Newman et al, 1988), similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio. En una revisión sistemática realizada por Hanon et al, sobre las condiciones de muestreo y almacenamiento que influyen en la medición de la hormona paratiroidea en muestras de sangre, concluyeron que la PTH era estable en plasma con EDTA separado durante al menos 48 horas a temperatura ambiente, pero que en el suero se puede perder una inmunorreactividad significativa después de tan solo 2 horas (Hanon et al, 2013).

Estas diferencias en los resultados se pueden explicar por la variabilidad de metodologías que existen para la determinación de PTH, como se explicó al inicio de este trabajo. Los ensayos de segunda y tercera generación miden diferentes mezclas de péptidos que pueden tener una estabilidad diferente (Hanon et al, 2013), la discrepancia entre ambos ensayos es principalmente en la determinación del fragmento N-terminal, en el de segunda generación se utiliza un anticuerpo monoclonal contra este fragmento y en el de tercer generación se utiliza un anticuerpo monoclonal específicamente contra los primeros 4 aminoácidos de este fragmento, posiblemente esta podría ser la causa de la diferencia en la estabilidad de la muestra.

Además, es necesario concluir que los resultados obtenidos en este estudio únicamente pueden aplicarse a nuestro laboratorio, ya que dependen del método analítico utilizado y de las condiciones del flujo de trabajo. Aunque sí pueden servir de guía para los laboratorios que utilicen el mismo analizador y el mismo método analítico.

Conclusiones

- Para este estudio, las muestras de suero para la determinación de PTH conservadas a temperatura ambiente, no presentan diferencias significativas en sus concentraciones comparadas con las concentraciones de las muestras de suero analizadas a 4°C.
- Igualmente, la estabilidad de las muestras de suero, se mantiene hasta un poco más de 5 horas con ambas temperaturas (4°C y temperatura ambiente), sin tener un efecto significativo en la concentración de PTH.
- Es relevante tomar en cuenta la metodología utilizada, además del flujo de trabajo de cada laboratorio al momento de definir las condiciones de procesamiento de este tipo de muestras, debido a que no existe una guía estandarizada para su determinación.

Referencias bibliográficas

1. Bustamante, X. (2018). Pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis se triplicó. Blog Caja Costarricense del Seguro Social. Consultado el 13/11/2019. Recuperado en: <https://www.ccss.sa.cr/noticia?pacientes-con-enfermedad-renal-cronica-en-dialisis-se-triplico>.
2. Butrón, M. (2017). Factores asociados a niveles de paratohormona en pacientes en hemodiálisis. Perú. [Tesis]. Consultado el: 09/11/2019. Recuperado en: http://www.repositorioacademico.usmp.edu.pe/bitstream/usmp/3378/3/butron_smm.pdf
3. Cavalier, E., et al. (2015). Considerations in parathyroid hormone testing. Clin Chem Lab Med 2015, p: 1-6. Consultado el 07/11/2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26035114>.
4. De la Piedra, C. et al. (2008). Diferencias en la función de los péptidos paratiroides. ¿Qué estamos midiendo? Revista de Nefrología, 28(2):123-128. Madrid, España. Disponible en: <https://www.revistanefrologia.com/es-comentarios-diferencias-funcion-los-peptidos-paratiroides-que-estamos-midiendo-articulo-X0211699508033080>.
5. Díaz, J. et al. (1997). Aspectos básicos de bioquímica clínica. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España, p: 139-146. Consultado el: 08/11/2019. Disponible en: <https://books.google.co.cr/books?id=Y1Qm0nRmAtsC&pg=PA139&dq=funcion+hormona+paratiroidea&hl=s419&sa=X&ved=0ahUKEwixmOWE5HIAhXkxIkKHSScADsQ6AEITDAF#v=onepage&q=funcion%20hormona%20paratiroidea&f=false>.
6. Fradinger, E. (2015). Controversias en la medición de parathormona. Actualizaciones en osteología: 11(2), pp: 178-184. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: http://www.osteologia.org.ar/files/pdf/rid42_7.pdf.
7. Hanon, E., C. Sturgeon, E. Lumb. (2013). Sampling and storage conditions influencing the measurement of parathyroid hormone in blood samples: a systematic review. Clin Chem Lab Med 2013; 51(10): 1925–1941. Consultado el: 05/11/2019. Disponible en: <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/cclm.2013.51.issue-10/cclm-2013-0315/cclm-2013-0315.pdf>.

8. Levin GE, Nisbet JA. (1994). Stability of parathyroid hormone-related protein and parathyroid hormone at room temperature. *Ann Clin Biochem*; 31:497–500.
9. Merle E, Roth H, London GM, et al. (2016). Low parathyroid hormone status induced by high dialysate calcium is an independent risk factor for cardiovascular death in hemodialysis patients. *Kidney Int*; 89(3):666-674.
10. Morales, C. et al. (2008). Estudio de la estabilidad de insulina testosterona y péptido Cen suero y de paratirina en suero y plasma. *Laboratorio Clínico*, 1(1): 8-12. Elsevier. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-estudio-estabilidad-insulina-testosterona-peptido-S1888400808749481>.
11. Newman DJ, Ashby JP. (1988). Clinical and laboratory evaluation of a two-site immunoradiometric assay for intact parathyroid hormone. *Ann Clin Biochem*; 25:654–60.
12. Quesada, A. (2015). Diagnóstico de Laboratorio. 2da edición. Litografía e Imprenta LIL, San José, Costa Rica, pp: 528.
13. Silverthon, D. (2009). Fisiología humana: un enfoque integrado. 4ta edición, Panamericana, Buenos Aires, p: 212-219. Consultado el: 05/11/19. Disponible en: https://books.google.co.cr/books?id=X5sKQuyd8q0C&pg=PA218&dq=hormonas+peptidicas&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjx4cPm_cLIAhVGTBoKHcW8D3wQ6AEIJzAA#v=onepage&q=hormonas%20peptidicas&f=false.
14. Sociedad Colombiana de Patología Clínica. (2017). Paratohormona. *Medicina y Laboratorio*; 23(1-2). Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-883551?lang=es>.
15. Souberbielle JC, Friedlander G, Cormier C. (2006). Practical considerations in PTH testing. *Clin Chim Acta*; 366:81-89.
16. Souberbielle JC, Roth H, Fouque D. (2010). Parathyroid hormone measurement in CKD. *Kidney Int*; 77:93-100.

17. Vela, A. et al. (2013). Hipoparatiroidismo. Revista Española de Endocrinología
Pediátrica: 4. Bilbao. Disponible en:
<https://www.endocrinologiapediatrica.org/revistas/P1-E6/P1-E6-S173-A161.pdf>.